

論文の内容の要旨

論文題目 アフリカツメガエルの初期胚予定神経領域における細胞の配列、張力の
変化の研究

氏名 山下 慧

初期発生において、組織の分化と形態形成、またその形態形成の原動力となる細胞の変形や物性の変化、再配列などは相互に影響を与え合っている。組織の分化に伴う増殖のスピード、細胞骨格、モータータンパク質や細胞間接着タンパク質の発現の変化は細胞の密度、形状、硬さ、または移動性を変化させ組織の形態形成を引き起こす。近年の研究では細胞間接着面のリモデリングによる細胞再配列が注目を集めている。同時に細胞は形態形成によって引き起こされた張力の変化などを敏感に感知し、細胞内にシグナルを伝えて転写制御をおこなっている。すなわち細胞の配列や硬さ、細胞間、細胞内で発生している張力は遺伝子の発現の変化と同等に組織の正常な発生において重要な役割を持つ。しかし、遺伝子の発現を解析する様々な手法が確立しているのに対し、細胞の配列や物性を解析する実験系は少なく十分な研究がなされてきていない。

本研究ではアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の原腸胚及び神経胚を用い、外胚葉から神経系と表皮がそれぞれ分化する際の細胞の配列、細胞内に発生する張力の変化を解析した。本博士論文は2章立てで構成されている。第1章では細胞の配列の研究について述べる。細胞接着の特性は細胞の分化状態とともに変化し、形態形成中の組織内において特異的な細胞再配列を引き起こしている。逆に、このような細胞配列の違いは接着の特性が変化した結果であると考えられる。すなわち、細胞配列は分化や表現型の指標になると期待される。しかし、一般の細胞配列を記述できる理論的な系も実

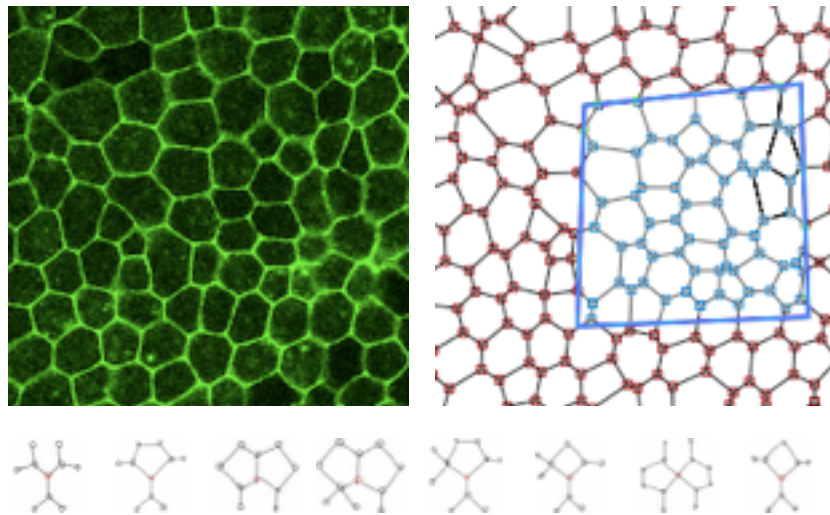


図1。細胞配列（上段左）のグラフモデル（上段右）。下段は上段右の四角枠の中に含まれる小さなグラフのリストである。

験系も確立されているものはない。成熟した組織ではよく特徴的な細胞配列が観察されるが、神経誘導が起きていると予想される原腸胚期、神経胚期においては細胞配列を見分ける有効な指標は報告されていない。本研究において私は細胞配列を定量的に扱えるよ

うにするために、細胞配列を細胞同士の隣接関係に簡略化したグラフモデルを用いた。細胞配列のグラフモデルは頂点モデルとも呼ばれ、3以上の細胞が接する点に頂点を、細胞間接着面に2頂点をつなぐ辺を対応させることで細胞シート上の細胞配列を表現する。ここでグラフとは頂点の集合と頂点をつなぐ辺の集合からなるグラフ理論の対象となる概念である。細胞群のグラフの中に相異なる小さなグラフがそれぞれどれほどの量含まれているかという観点から細胞配列を記述する方法を新しく定義した。ベクトル形式で表されるこの記述法により細胞配列を領域間で比較することが可能になった。*Xenopus*の外胚葉を解析したところ、原腸胚期後期においてベクトルの変化する部位が背側と腹側の中間に現れ、神経胚期初期にその部位は背側正中線に向かって移動した。この移動は予定神経領域の境界の移動と大まかに一致した。さらに、細胞配列が変化する領域の境界は神経-表皮境界と一致した。以上の結果より、細胞配列のグラフモデルは顕微鏡写真の直感的な観察では弁別することのできなかった細胞配列間の違いを見分けることができることが示された。細胞配列の境界の挙動は神経-表皮の境界と一致すること、さらには神経領域の決定が原腸胚期後期に始まっていることを示唆している。

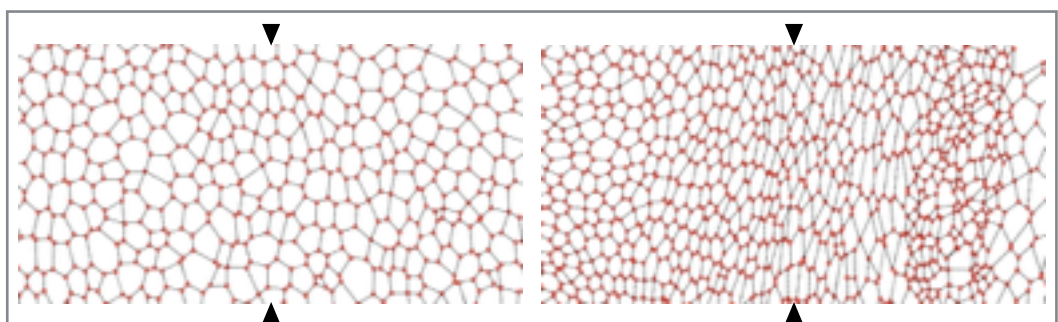


図2。原腸胚期（左）と神経胚期（右）の細胞配列。黒三角の場所に細胞配列の境界が検出された。

第2章では細胞内に発生する張力の研究について述べる。外胚葉で細胞にかかっている張力を測定するため本研究ではFRET張力センサーを用いた。FRET張力センサーは2つの蛍光ドメインを伸縮性のリンカーでつなぎ、センサーに張力がかかってリンカーが引き伸ばされた時蛍光ドメイン間のFRET効率が変化するのを利用して細胞内の張力分布を計測する分子プローブである。FRET張力センサーはもともと培養細胞系で開発されたプローブであり胚での利用が報告されているものがなかったため、プローブの張力センサーとしての機能の評価から行った。本研究で用いた張力センサーはアクチンフィラメントを架橋する構造タンパク質であるアクチニンにFRETドメインを挿入したもので、これをHEK細胞または*Xenopus*胚の外胚葉に導入したところ、アクチンフィラメントと共局在した。また、FRAP解析により、センサーが正常なアクチニンと同じ動態を持つことが示唆された。アクチンフィラメントの重合阻害やミオシンの不活性化、浸透圧の変化により細胞内の張力を変化させたところ、センサーのFRET効率にも変化が観察され、このセンサーが張力計測に利用できることが確かめられた。このセンサーを用いて原腸胚期から神経胚期にかけての外胚葉の細胞内に発生している張力を測定したところ、表皮領域に比べ予定神経領域で高い張力が発生していることがわかった。また、張力の高い予定神経領域に比べ、隣接する側方予定表皮領域では細胞が前後軸方向に伸長していた。そこで、膜局在型のGFPを外胚葉全体で発現させ、継時観察して細胞と組織の変形を解析した。個々の細胞を追跡し、細胞の中心の移動速度から組織の速度勾配テンソルを計算して回転速度テンソルと歪み速度テンソルに分解したところ、予定神経領域と表皮領域はどちらも同様に前後軸方向に伸長していた。しかし、ここの細胞の伸長速度を比較したところ、側方予定表皮領域では細胞自身が伸長することにより、また予定神経領域では細胞が再配列することにより細胞群全体が前後軸方向に伸長していることがわかった。これらの結果は、予定神経領域の細胞は表皮領域の細胞よりも強い張力をアクチンフィラメント上に発生させており、強い張力は外側からの力に対する細胞の硬さとして現れたということを示唆している。力は外側からの力に対する細胞の硬さとして現れたということを示唆している。予定神経領域と側方表皮領域は両方とも中胚葉によって前後軸方向に引き伸ばされており、予定神経領域では硬い細胞が再配列を起こすことで、表皮領域では柔らかい細胞自身が変形することで組織を変形させていると考えられる。

第1章と第2章の結果から、アフリカツメガエルの外胚葉では原腸胚期後期から表皮領域と神経領域の間で細胞配列、細胞内に発生している張力の両方が変化していることがわかった。神経領域で

は表皮領域に比べより活発に細胞再配列が起こっており、その差が両領域間の細胞配列の違いを生み出していると考えられる。細胞内に発生している張力は細胞の外力に対する硬さとして組織の形態形成時に細胞の変形、再配列を制御している可能性が示唆された。

